

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年8月7日 (07.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/064671 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 21/00 (74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI,Takashi); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00995
- (22) 国際出願日: 2003年1月31日 (31.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-23138 2002年1月31日 (31.01.2002) JP
特願2002-23139 2002年1月31日 (31.01.2002) JP
特願2002-23140 2002年1月31日 (31.01.2002) JP
- (71) 出願人および
(72) 発明者: 遠藤弥重太 (ENDO,Yaeta) [JP/JP]; 〒791-8016 愛媛県松山市久万ノ台478-17 Ehime (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 土肥直樹 (DOHI,Naoki) [JP/JP]; 〒712-8054 岡山県倉敷市潮通三丁目10番地 三菱化学株式会社内 Okayama (JP). 中川周 (NAKAGAWA,Makoto) [JP/JP]; 〒712-8054 岡山県倉敷市潮通三丁目10番地 三菱化学株式会社内 Okayama (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 國際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: GERM EXTRACT FOR CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液及びその製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing a plant germ extract wherein the step of breaking a plant germ into fine pieces is carried out by impacting or cutting and/or in the presence of an extraction solvent, and a germ extract obtained by this process which is contaminated with little impurities unnecessary or exerting undesirable effects in cell-free protein synthesis. Thus, cell-free protein synthesis can be performed at a high stability and a high efficiency.

(57) 要約:

A1 本発明は、植物胚芽を細分化する工程を衝撃又は切断により行う、及び／又は抽出溶媒の存在下に行う、植物胚芽抽出液の製造方法、及び当該方法によって得られる無細胞タンパク質の合成に必要な、あるいは悪影響を及ぼす不純物の少ない胚芽抽出液を提供し得る。本発明によれば安定で高い効率の無細胞タンパク質合成が可能となる。

WO 03/064671

明細書

無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液及びその製造方法

技術分野

本発明は、無細胞タンパク質合成用の胚芽抽出液及びその製造方法に関する。

- 5 更に詳しくは合成効率の高い無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液及びそれを工業的に効率よく製造するための方法等に関するものである。

背景技術

細胞内でおこなわれているタンパク質の合成反応は、まず遺伝情報をもつDNAからその情報がmRNAに転写され、そしてリボソームがそのmRNAの情報10を翻訳して、タンパク質を合成するという工程で進行している。現在、この細胞内におけるタンパク質合成を試験管等の生体外で行う方法として、例えばリボソームを生物体から抽出し、これらを用いて試験管内でタンパク質合成反応を行わせしめる、無細胞タンパク質合成の研究が盛んに行われている（特開平6-98790号公報、特開平6-225783号公報、特開平7-194号公報、特15開平9-291号公報、特開平7-147992号公報）。この方法には、リボソームの原料として、大腸菌、植物胚芽、家兎網状赤血球等が用いられてきた。
植物胚芽からリボソームを含有する無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液を得る方法としては、通常、植物種子を粉碎した後、種皮や胚乳画分を取り除いて粗胚芽画分を取得し、更に洗浄により胚乳成分を除去した後、粉碎、抽出、精製する20方法が行われている。

従来の胚芽の微粉碎方法としては、リボソームやtRNA等のタンパク質合成成分を含む水溶性成分の抽出の効率化を図るために、胚芽をできるだけ細かく粉碎することが必要だと考えられていた。しかしながら、胚芽は小さく強度も高いため容易に粉碎することができない。従って、従来は、洗浄後の胚芽を予め液体25窒素等で凍結した後、乳鉢、スタンプミル、ボールミル等で摩碎又は圧碎することにより微粉碎する方法が広く用いられており、このように微粉碎された胚芽に抽出溶媒を加えて攪拌した後、遠心分離等により胚芽抽出物含有液（胚芽抽出

液) を回収、精製したものを無細胞タンパク質合成反応のための“酵素原液”として利用していた。この“酵素原液”中には、タンパク質合成反応に関与しない不要な成分が多く含まれており、またタンパク質合成阻害作用を有するものが存在している可能性がある。

- 5 また、上記従来法によって得られた抽出液にはタンパク質合成反応に必要とされる量の t R N A が含まれていないことから、別途調製した t R N A を追加することが必須要件であった。さらに、上記従来法では短時間に大量の抽出液を得ることが困難であった。

発明の開示

- 10 本発明者らは、上記課題を解決するために、無細胞タンパク質合成系に使用する胚芽抽出液のタンパク質の合成効率を上げるとともに、その抽出液を工業的に実施可能な程度に効率的に製造し、植物胚芽から効率的にタンパク質合成に必要な因子を抽出する方法について検討した結果、本発明に到達した。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- 15 (1) リボヌクレアーゼ活性が低減された、植物胚芽抽出液。
 (2) リボヌクレアーゼ活性が R N a s e A 換算で $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以下である、
 上記 (1) 記載の胚芽抽出液。
 (3) 抽出溶媒非存在下に植物胚芽を摩碎または圧碎して細分化する工程を含む
 方法 (以下、単に従来法ともいう) により得られる胚芽抽出液と比較してリボヌ
- 20 クレアーゼ活性が 80 % 以下に低減された上記 (1) または (2) 記載の胚芽抽
 出液。
 (4) 260 nm における光学密度 (O. D.) (A_{260}) が 90 の時の DNA
 含有量が $230 \mu\text{g}/\text{ミリリットル}$ 以下であることを特徴とする植物胚芽抽出液。
 (5) 260 nm における光学密度 (O. D.) (A_{260}) が 90 の時の総脂肪
- 25 酸 (パルミチン酸、オレイン酸及びリノール酸) 含有量の合計量が $0.03 \text{ g}/1.00 \text{ g}$ 以下である植物胚芽抽出液。
 (6) 260 nm における光学密度 (O. D.) (A_{260}) が 90 の時の DNA

含有量が $230\mu\text{g}/\text{ミリリットル}$ 以下であり、かつ総脂肪酸含有量が $0.03\text{g}/100\text{g}$ 以下である植物胚芽抽出液。

(7) 植物胚芽が、コムギ、オオムギ、イネ又はコーンの胚芽である上記(1)～(6)のいずれか1項に記載の胚芽抽出液。

5 (8) 植物胚芽を衝撃又は切断により細分化する工程を含む、植物胚芽抽出液の製造方法。

(9) 抽出溶媒の存在下に植物胚芽を細分化する工程を含む、植物胚芽抽出液の製造方法。

(10) 抽出溶媒が、緩衝液、カリウムイオン、マグネシウムイオン及びチオ

10 ル基の酸化防止剤からなる群より選択される1以上を含むものである上記(9)記載の製造方法。

(11) 細分化が衝撃又は切断により行われるものである、上記(9)記載の製造方法。

(12) 植物胚芽が、胚乳成分が実質的に夾雜しないものである上記(8)～

15 (11)のいずれか1項に記載の製造方法。

(13) 植物胚芽が、コムギ、オオムギ、イネ又はコーンの胚芽である上記

(8)～(12)のいずれか1項に記載の製造方法。

(14) 上記(8)～(13)のいずれか1項に記載の製造方法により得られる植物胚芽抽出液。

20 (15) 上記(1)～(7)および(14)のいずれか1項に記載の胚芽抽出液を使用することを特徴とする無細胞タンパク質合成方法。

(16) 上記(1)～(7)および(14)のいずれか1項に記載の胚芽抽出液、

ATP、GTP、クレアチニン酸、クレアチンキナーゼ、L型アミノ酸、カリ

ウムイオン及びマグネシウムイオンを含有することを特徴とする無細胞タンパク

25 質合成用溶液。

(17) 少なくとも、上記(1)～(7)および(14)のいずれか1項に記載の胚芽抽出液を含有する無細胞タンパク質合成用溶液であって、tRNAを添加

しなくとも十分なタンパク質合成活性を有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用溶液。

(18) 少なくとも、上記(1)～(7)および(14)のいずれか1項に記載の胚芽抽出液を含むことを特徴とする無細胞タンパク質合成を行うためのキット。

5 (19) 少なくとも、上記(16)または(17)記載の無細胞タンパク質合成用溶液を含むことを特徴とする無細胞タンパク質合成を行うためのキット。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1で得られた胚芽粉碎物の粒径分布を示す図である。

図2は、比較例1で得られた胚芽粉碎物の粒径分布を示す図である。

10 図3は、実施例2及び比較例2で合成したGFPの蛍光強度を示す図である。

図4は、実施例7及び比較例6でのDHFの合成結果を示す図である。縦軸はタンパク質に取り込まれた放射活性 ($[^{14}\text{C}]$ -ロイシン取り込み量: dpm / $5\mu\text{l}$) を、横軸はtRNAの添加量を示す。

図5は、本発明の胚芽抽出液および従来法による抽出によって得られる胚芽抽

15 出液のリボヌクレアーゼ活性を測定した結果を表す電気泳動像である。(A)は、基質であるmRNAを、濃度を4段階に変えて調製したRNase A含有溶液で処理した場合のRNA分解の様子を示した図である。(B)基質であるmRNAを、本発明の胚芽抽出液および従来法による抽出によって得られる胚芽抽出液でそれぞれ処理した場合のRNAの分解を示す図である。尚、Mはマーカーを表す。

20 図6は図5で得られた電気泳動像においてバンドの濃さを測定し、RNase A未処理の場合を100% (RNAは分解しない) として、残存するRNAの量を表したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

25 本発明で用いられる植物胚芽は、植物種子より取得できる。用い得る植物種子としては、通常、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物から選択される植物の種子が挙げられる。これらの中でも、本発明に好適な植物種子として、

上記コムギ、オオムギ、イネまたはコーンが挙げられ、特に好適なものとしてコムギが挙げられる。

植物種子に含まれる胚芽の量は少ないため、胚芽を効率的に取得するためには胚芽以外の部分をできるだけ除去しておくことが好ましい。通常、まず、植物種子に機械的な力を加えることにより、胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物を得、該混合物から、胚乳破碎物、種皮破碎物等を取り除いて粗胚芽画分（胚芽を主成分とし、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物）を得る。植物種子に加える力は、植物種子から胚芽を分離することができる程度の強さであればよい。

通常は、公知の粉碎装置を用いて、植物種子を粉碎することにより、胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物を得る。

植物種子の粉碎は、通常公知の粉碎装置を用いて行うことができるが、ピンミル、ハンマーミル等の被粉碎物に対して衝撃力を加えるタイプの粉碎装置を用いることが好ましい。粉碎の程度は、使用する植物種子胚芽の大きさに応じて適宜選択すればよいが、例えばコムギ種子の場合は、通常、最大長さ4mm以下、好ましくは最大長さ2mm以下の大ささに粉碎する。また、粉碎は乾式で行うのが好ましい。

次いで、得られた植物種子粉碎物から、自体公知の分級装置、例えば、篩を用いて粗胚芽画分を取得する。例えば、コムギ種子の場合、通常、メッシュサイズ0.5mm～2.0mm、好ましくは0.7mm～1.4mmの粗胚芽画分を得する。さらに、必要に応じて、得られた粗胚芽画分に含まれる種皮、胚乳、ゴミ等を風力、静電気力をを利用して除去してもよい。

また、胚芽と種皮、胚乳の比重の違いを利用する方法、例えば重液選別により、粗胚芽画分を得ることもできる。より多くの胚芽を含有する粗胚芽画分を得るために、上記の方法を複数組み合わせてもよい。さらに、得られた粗胚芽画分から、例えば目視や色彩選別機等を用いて胚芽を選別する。

このようにして得られた胚芽画分は、胚乳成分が付着している場合があるため、通常、胚芽純化のために更に洗浄処理することが好ましい。

洗浄処理としては、通常10°C以下、好ましくは4°C以下に冷却した水又は水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させ、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することが好ましい。また、通常10°C以下、好ましくは4°C以下で、界面活性剤を含有する水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄する
5 ののがより好ましい。界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましく、非イオン性界面活性剤であるかぎりは、広く利用ができる。具体的には、例えば、好適なものとして、ポリオキシエチレン誘導体であるブリッジ (B r i j)、トリトン (T r i t o n)、ノニデット (N o n i d e t) P 4 0、ツイーン (T w e e n) 等が例示される。なかでも、ノニデット (N o n i d e t) P 4 0 が最適
10 である。これらの非イオン性界面活性剤は、例えば0.5%の濃度で使用することができます。

水又は水溶液による洗浄処理および界面活性剤による洗浄処理は、どちらか一方でもよいし、両方実施してもよい。また、これらの洗浄処理は、超音波処理との組み合わせで実施してもよい。

15 上記のように植物種子を粉碎して得られた粉碎物から植物胚芽を選別した後、洗浄して得られた無傷（発芽能を有する）の胚芽を抽出溶媒の存在下または非存在下に細分化して、後者の場合、さらに該細分化された植物胚芽を抽出溶媒で抽出することによって胚芽抽出物を得、胚芽抽出物含有液（以下単に胚芽抽出液）を分離・精製する。

20 本発明において細分化は、摩碎、圧碎等の胚芽の粉碎方法として従来公知の方法を用いて行うこともできるが、衝撃または切断により胚芽を細分化することがより好ましい。特に、抽出溶媒の非存在下に胚芽を細分化するに際しては、衝撃または切断によることが望ましい。ここで、「衝撃または切断により細分化する」とは、植物胚芽の細胞核、ミトコンドリア、葉緑体等の細胞小器官（オルガ
25 ネラ）、細胞膜や細胞壁等の破壊を、従来の摩碎又は圧碎と比べて最小限に止めうる条件で植物胚芽を破壊することを意味する。

衝撃または切断により胚芽を細分化する際に用いることのできる装置や方法と

しては、上記条件を満たすものであれば特に限定されないが、例えば、ワーリングブレンダーのような高速回転する刃状物を有する装置を用いることが好ましい。刃状物の回転数は、通常 1000 r p m 以上、好ましくは 5000 r p m 以上であり、また、通常 30000 r p m 以下、好ましくは 25000 r p m 以下である。
5 刃状物の回転時間は、通常 5 秒以上、好ましくは 10 秒以上である。回転時間の上限は特に限定されないが、通常 10 分以下、好ましくは 5 分以下である。細分化する際の温度は、胚芽のタンパク質合成能力が失われない温度であれば特に限定されないが、好ましくは 10 °C 以下で細分化の操作が可能な温度範囲、特に好ましくは 4 °C 程度が適当である。

10 一方、摩碎、圧碎により胚芽を細分化する場合には、乳鉢と乳棒、スタンプミル、ボールミル等の公知の装置を用いて、抽出溶媒の存在下で胚芽を磨り潰し又は圧し潰すことにより行うことができる。この場合の溶媒としては上記したものと同様のものが好ましい。

特に好適な細分化法としては、上述のように衝撃または切断による細分化が挙げられるが、かかる手法を用いることにより、胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁を全て破壊してしまうのではなく、少なくともその一部を破壊することなく残すことが可能になる。即ち、胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁が必要以上に破壊されないため、それらに含まれるDNAや脂質等の不純物の混入が少なく、細胞質に局在するタンパク質合成に必要なRNAや
20 リボソーム等を高純度で効率的に胚芽から抽出することができる。

胚芽の細分化は抽出溶媒の存在下あるいは非存在下で行うことができる。

胚芽の細分化を抽出溶媒の存在下で行う場合には、具体的には以下の手順で行なわれる。

胚芽を細分化（好ましくは、衝撃または切断により）する際に抽出溶媒を存在
25 させることにより、植物胚芽を細分化する工程と細分化された植物胚芽を抽出溶媒で抽出する工程とを同時に行う。この場合、胚芽と抽出に必要な量の抽出溶媒とを混合し、抽出溶媒の存在下に胚芽を細分化する。抽出溶媒の量は、洗浄前の

胚芽 1 g に対して、通常 0.1 ミリリットル以上、好ましくは 0.5 ミリリットル以上、より好ましくは 1 ミリリットル以上である。抽出溶媒量の上限は特に限定されないが、通常、洗浄前の胚芽 1 g に対して、10 ミリリットル以下、好ましくは 5 ミリリットル以下である。混合物を遠心分離等により分離し、得られる

- 5 上清を胚芽抽出液として回収する。さらにゲルろ過等の精製工程に付してもよい。

細分化と溶媒抽出とを同時に一つの工程として行えば、効率的に胚芽抽出液を得ることができ、細分化後に抽出を行う場合に比べて、胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁の破壊が抑えられた状態でも細胞質に局在するタンパク質合成に必要な因子を十分に抽出することができる。

- 10 また、胚芽の細分化を抽出溶媒の非存在下で行う場合には、具体的には以下の
ような手順で行われる。まず細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁が必要以上
に破壊されないように、細分化した、好ましくは、衝撃又は切断により細分化した
胚芽に抽出溶媒を加えて攪拌した後、混合物を遠心分離等により分離し、得ら
れる上清を胚芽抽出液として回収する。さらにゲルろ過等の精製工程に付しても
15 よい。使用する抽出溶媒の量やその上限は、上記した抽出溶媒の存在下で胚芽を
細分化する場合と同様な値が設定される。

細分化しようとする胚芽は従来のように凍結させたものを用いてもよいし、凍
結させていないものを用いてもよいが、凍結させていないものを用いるのが好ま
しい。

- 20 抽出溶媒としては、緩衝液、カリウムイオン、マグネシウムイオン及びチオ一
ル基の酸化防止剤のうちの少なくとも 1 つを含む水溶液を用いることができる。
また、必要に応じて、カルシウムイオン、L 型アミノ酸等をさらに添加してもよ
い。例えば、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N' -2-エタンスルホン
酸 (HEPES) -KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、L 型アミノ酸及
25 び／又はジチオスレイトールを含む溶液や、Patterson らの方法を一部改変した
溶液 (HEPES-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、
L 型アミノ酸及び／又はジチオスレイトールを含む溶液) を抽出溶媒として使用

することができる。抽出溶媒中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク質合成用の胚芽抽出物の製造法に通常用いられるものを採用すればよい。

ゲルろ過としては、例えば予め溶液（HE P E S-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオスレイトール又はL型アミノ酸を含む溶媒）で平衡化しておいたゲルろ過装置を用いて行うことができる。ゲルろ過溶液中の各成分の組成・濃度もそれ自体既知であり、無細胞タンパク質合成用の胚芽抽出物の製造法に通常用いられるものを採用すればよい。

ゲルろ過後の胚芽抽出液には、微生物、特に糸状菌（カビ）などの胞子が混入していることがあり、これら微生物を排除しておくことが好ましい。特に長期（1日以上）の無細胞タンパク質合成反応中に微生物の繁殖が見られるがあるので、これを阻止することは重要である。微生物の排除手段は特に限定されないが、ろ過滅菌フィルターを用いるのが好ましい。フィルターのポアサイズとしては、混入する可能性のある微生物が排除可能なサイズであれば特に限定されないが、通常0.1~1マイクロメーター、好ましくは0.2~0.5マイクロメーターが適当である。ちなみに、小さな部類の枯草菌の胞子サイズは $0.5\text{ }\mu\text{m} \times 1\text{ }\mu\text{m}$ であることから、0.20マイクロメーターのフィルター（例えばSartorius製のMinisartTM等）を用いるのが胞子の除去にも有効である。ろ過に際して、先ずポアサイズが大きめのフィルターを用い、次に混入する可能性のある微生物が排除可能なポアサイズのフィルターを用いて、ろ過するのが好ましい。

本発明においては、好ましくは抽出溶媒の存在下で胚芽の細分化を行い、特に好ましくは抽出溶媒の存在下で衝撃又は切断化による胚芽の細分化を行う。

このようにして得られた胚芽抽出液は、原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質（トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ、ホスファターゼ等の、mRNA、tRNA、翻訳因子タンパク質やリボソーム等に作用してその機能を抑制する物質）を含む胚乳が実質的に夾雜せず、純化されている。ここで、「胚乳が実質的に夾雜しない」とは、リボソームが実質的に脱

アデニン化されない程度まで胚乳部分を取り除いた胚芽抽出物のことであり、また、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度とは、リボソームの脱アデニン化率が7%未満、好ましくは1%以下になっていることをいう。

また、当該胚芽抽出液中に混入し得る低分子量のタンパク質合成機能を抑制する物質を透析等により排除することにより、よりタンパク質合成能に優れた胚芽抽出液が得られる。かかる排除工程はATPやGTP、アミノ酸等の安定化成分の存在下で実施することが好ましい。

さらに本発明の胚芽抽出液、例えば上記した手順により得られる胚芽抽出液は、リボヌクレアーゼ活性が低減されていることを特徴とする。ここで「低減された」とは、従来公知の胚芽抽出液の調製方法によって得られた無細胞タンパク質合成用の植物胚芽抽出液と比較した場合にその活性がより低いことを意図し、具体的には植物胚芽の細分化を、抽出溶媒非存在下に摩碎又は圧碎して行う方法（即ち、従来法）により得られた胚芽抽出液と比較してリボヌクレアーゼ活性がRNase A換算で85%以下、好ましくは80%以下、より好ましくは75%以下に抑えられた胚芽抽出液が該当する。例えば本発明のリボヌクレアーゼが低減された胚芽抽出液は、リボヌクレアーゼ活性がRNase A換算で10pg/ μ l以下である。

リボヌクレアーゼ活性はそれ自体既知の方法で測定することができるが、具体的にはリボヌクレアーゼの基質としてmRNA（当該mRNAの種類は特に限定されず、本発明の胚芽抽出液と対照となる胚芽抽出液（従来の抽出法により得られる胚芽抽出液）とによる比較実験において同種のものを使用する限り適宜選択し得ることは当業者には明らかである）を用い、当該mRNAを各胚芽抽出液で処理した際のRNA分解の程度を調べることによって本発明の胚芽抽出液に混入しているリボヌクレアーゼ活性を相対的に知ることができるし、また、その際、標準品として濃度既知のリボヌクレアーゼ、例えばRNase AによるRNA分解の程度と比較することによって本発明の胚芽抽出液に混入しているリボヌクレアーゼの量を知ることができる。本明細書において「RNase A換算で」とは、

その値が、標準品として用いる濃度既知のリボヌクレアーゼとしてRNaseAを用いた場合に得られたものであることを示している。具体的手法は後述する。

また、本発明の胚芽抽出液、例えば上記した手順により得られる胚芽抽出液は260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が90の時のDNA含有量5が230μg/ミリリットル以下、好ましくは200μg/ミリリットル以下、より好ましくは180μg/ミリリットル以下である。本発明において、DNAの含有量は以下の方法により測定した値である。

DNA含有量の測定方法

PicoGreen dsDNA quantitation reagent(モレキュラープローブ社製)を用い、10 Calf Thymus DNA Standard(ファルマシアバイオテク社製)を標準試料として、マイクロプレート蛍光光度計(SPECTRAmax GEMINI XS、モレキュラーデバイス社製)を用いて測定する。

まず、試料200マイクロリットルにproteinase K(10mg/ミリリットル)を10マイクロリットル加え、55℃で一晩反応させる。反応液を等量の15フェノールで抽出後、さらに等量のフェノール・クロロフォルム(1:1)で抽出して除蛋白し、1/10量の3モル/リットル酢酸ナトリウムおよび2倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行う。70%エタノールで洗浄後、1ミリモル/リットル エチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含む10ミリモル/リットル トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)(TE)に溶解する。この溶液に20 RNaseA(10mg/ミリリットル)を5マイクロリットル加えて37℃で一晩反応させ、上記と同様にフェノールおよびフェノール・クロロフォルムで抽出してRNAを除去する。試料はエタノール沈殿・洗浄し、TE 200マイクロリットルに溶解する。TEで200倍に薄めたPicoGreen dsDNA quantitation reagentとTEで適当な濃度に薄めた試料を1:1の比率で混ぜ、励起/蛍光波長485/530nmで蛍光度測定して、標準曲線からDNA含有量を算出する。

また、本発明の胚芽抽出液は、260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が90の時の260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が90

の時の総脂肪酸含有量が0.03g／100g以下、好ましくは0.02g／100g以下、より好ましくは0.018g／100g以下である。本発明において、総脂肪酸含有量は以下の方法（ガスクロマトグラフ法）により測定した値である。本発明において、総脂肪酸含有量とは、パルミチン酸、オレイン酸及びリノール酸含有量の合計量である。

総脂肪酸含有量の測定法

試料5.0gに、ヘプタデカン酸2mg（内標準）、エタノール4ミリリットル、イオン交換水6.7ml及び12モル／リットルの塩酸8.3ミリリットルを添加し、酸分解を行う。次いで、エタノール16ミリリットルを添加し、ジエチルエーテル－石油エーテル混液（容量比1：1）100ミリリットルを添加して抽出処理し、該混液60ミリリットルによる抽出処理を2回行う。水洗、抽出溶媒留去の後、ACOS Official Method Ce 1b-89 (1997)に準じて、けん化及びメチルエステル化を行った後、下記の操作条件でガスクロマトグラフによる測定を行う。

15 <ガスクロマトグラフ操作条件>

測定機種：島津製作所製 GC-17A

検出器：FID

カラム：J&W製 DB-23, $\phi 0.25\text{mm} \times 30\text{mm}$, df. $0.25\mu\text{m}$

カラム温度：70°C（1分間保持）→170°C（10°C／分昇温）→210°C

20 (1. 2°C／分昇温)

注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

ガス流量：ヘリウム 1.5ミリリットル／分

ガス圧力：水素 60kPa、空気 50kPa

25 導入系：スプリットレス

得られた測定値から下記式により、各脂肪酸（パルミチン酸、オレイン酸及びリノール酸）の含有量を計算し、これらから総脂肪酸含有量を算出する。

$$\text{各脂肪酸含有量 (g/100g)} = (E \times F \times H / D \times G) \times 0.1$$

(上記式中、Dはヘプタデカン酸のピーク面積、Eは各脂肪酸のピーク面積、Fはヘプタデカン酸添加量 (mg) 、Gは試料採取量、Hは感度補正係数 (予め測定したヘプタデカン酸に対する各脂肪酸の感度) を表す。)

- 5 さらに、本発明の胚芽抽出液、例えば上記した手順により得られる胚芽抽出液は、それを用いて無細胞タンパク質合成を行う際、従来の抽出法により得られる胚芽抽出液を用いた場合に比べ、ATP等のエネルギー源の消費を抑えることが可能である。このことは、本発明の胚芽抽出液のホスファターゼ活性が低減されている可能性を示唆するものである。
- 10 本発明はまた、本発明の胚芽抽出液を使用することを特徴とする無細胞タンパク質の合成方法を提供する。
- 当該無細胞タンパク質合成方法は、上記のようにして得られた胚芽抽出液を使用する点を除き、従来と同様の方法で行うことができる。この方法は、公知のバッチ法であってもよいし、Spirin ら (A. S. Spirin et al. (1988), Science, 15 242, 1162-1164) や横山らの (木川ら、第21回日本分子生物学会、WID6) の連続式無細胞系タンパク質合成システムのようなアミノ酸、エネルギー源の連続供給系であってもよい。バッチ法ではタンパク質合成を長時間行うと反応が停止することがあるため、後者のアミノ酸、エネルギー源の連続供給系を使用することにより、反応を長時間維持させることができ、更なる効率化が可能となる。
- 15 20 また、連続供給系でタンパク質を合成する場合には、透析法を使用することもできる。例えば、本発明の胚芽抽出液を透析内液に、エネルギー源やアミノ酸を含む混合液を透析外液に用いた限外濾過膜透析系では、タンパク質を連続的に大量調製することが可能である。ここで、エネルギー源としては、アデノシン三リン酸 (ATP)、グアノシン三リン酸 (GTP)、クレアチニン酸等が挙げられ、
- 25 アミノ酸としては20種類のL型アミノ酸が挙げられる。

本発明の胚芽抽出液 (抽出溶媒の存在下に胚芽の細分化を行うことを特徴とする方法によって得られる胚芽抽出液、あるいは抽出溶媒非存在下に胚芽を衝撃又

は切断によって細分化し、その後抽出溶媒で抽出することを特徴とする方法によって得られる胚芽抽出液)においては、その調製の際に胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁等の必要以上の破壊が抑えられているので、例えばリボヌクレアーゼの混入が極めて低減化されている。このように、タンパク質合成に必要な t RNA がリボヌクレアーゼによる分解を受けることが少ないので、本発明の胚芽抽出液にはタンパク質合成反応に必要とされる量の t RNA が通常含まれているため、従来のように、別途調製した t RNA を追加することは必須要件ではない。このような胚芽抽出液は、少なくとも植物胚芽抽出物を含有する無細胞タンパク質合成用溶液として機能し、タンパク質合成に必須あるいは適当とされる成分である ATP、GTP、クレアチニン酸、クレアチニナーゼ、L型アミノ酸、カリウムイオン及びマグネシウムイオン等が存在すれば t RNA を添加しなくとも十分なタンパク質合成活性を有するものである。ここで、「t RNA を添加しなくとも十分なタンパク質合成活性を有する」無細胞タンパク質合成用溶液とは、後記実施例で示す通り、t RNA を添加しなくとも従来の植物胚芽を予め液体窒素等で凍結し、乳鉢等で摩碎又は圧碎した後で溶媒抽出して調製した胚芽抽出液に十分量（タンパク質合成量がプラトーに達する量）の t RNA を添加したものと少なくとも同等のタンパク質合成活性を有する無細胞タンパク質合成用溶液、好ましくは、t RNA 無添加の場合のタンパク質合成活性が、t RNA を添加した際のタンパク質合成活性と同等あるいは同等以上である当該溶液を意味する。

さらに、上記した t RNA を添加しなくとも十分なタンパク質合成活性を有するような本発明の胚芽抽出液と、ATP、GTP、クレアチニン酸、クレアチニナーザ、L型アミノ酸、カリウムイオン及びマグネシウムイオン等のタンパク質合成に必須あるいは適当とされる成分とを含有する水溶液はレディーメイド型無細胞タンパク質合成溶液として、簡便に使用することができる。上記成分の含有量は特に限定されず、無細胞タンパク合成反応を行いうる濃度であればよい。このようなレディーメイド型無細胞タンパク質合成溶液は、タンパク質合成に際

して従来のように反応溶液の調製を必要とせず、目的とする翻訳錆型 (mRN A) を添加するだけで、簡便に、効率的に、大量にタンパク質を合成することができる。該タンパク質合成用溶液は、溶媒として上記抽出溶媒を用い、それに必要に応じて上記成分を添加することにより調製できる。

- 5 本発明の無細胞タンパク質合成を行うためのキットは、少なくとも上記胚芽抽出液または無細胞タンパク質合成用溶液を含み、任意の要素として、無細胞タンパク質合成に必要な他の試薬類や反応容器、例えば希釈液（緩衝液）、透析液、エネルギー源、発現ベクター、陽性コントロール用発現ベクター、基質となるアミノ酸、透析チューブ等を含んでいてもよい。また、該試薬キットにはRNAポ
- 10 リメラーゼ等の転写系に用いる試薬が含まれていてもよい。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

- 15 なお、以下の実施例において、lはリットル、mlはミリリットル、Mはモル／リットル、mMはミリモル／リットル、 μ gはマイクログラムをそれぞれ表す。

実施例 1 ワーリングブレンダーによる微粉碎抽出 (1)

- 北海道産のチホク小麦（未消毒）を1分間に100gの割合でミル（Fritsch社製 Rotor Speed Mill pulverisette 14型）に添加し、回転数7000 rpmで種子を温かく破碎した。この破碎処理を4回繰り返して行った。篩いで発芽能を有する胚芽を含む画分（メッシュサイズ0.71mm～1.00mm）を回収した後、四塩化炭素とシクロヘキサンの混合液〔四塩化炭素：シクロヘキサン=2.4:1（容量比）〕を用いた重液選別によって、発芽能を有する胚芽を含む浮上画分を回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した後、室温送風によって混在する種皮等の不純物を除去して粗胚芽画分を得た。

次に、ベルト式色彩選別機BLM-300K（製造元：株式会社安西製作所、発売元：株式会社安西総業）を用いて、次の通り、色彩の違いを利用して粗胚芽

画分から胚芽を選別した。この色彩選別機は、粗胚芽画分に光を照射する手段、粗胚芽画分からの反射光及び／又は透過光を検出する手段、検出値と基準値とを比較する手段、基準値より外れたもの又は基準値内のものを選別排除する手段を有する装置である。

- 5 色彩選別機のベルト上に粗胚芽画分を1000乃至5000粒/m²となるよう供給し、ベルト上の粗胚芽画分に蛍光灯で光を照射して反射光を検出した。ベルトの搬送速度は、50m/分とした。受光センサーとして、モノクロのCCDラインセンサー（2048画素）を用いた。

- まず、胚芽より色の黒い成分（種皮等）を排除するために、ベージュ色のベルトを取り付け、胚芽の輝度と種皮の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。次いで、胚乳を選別するために、濃緑色のベルトに取り替えて胚芽の輝度と胚乳の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。吸引は、搬送ベルト上方約1cm位置に設置した吸引ノズル30個（長さ1cm当たり吸引ノズル1個並べたもの）を用いて
- 15 行った。

この方法を繰り返すことにより胚芽の純度（任意のサンプル1g当たりに含まれる胚芽の重量割合）が98%以上になるまで胚芽を選別した。

- 上記によって得られた小麦胚芽50gを4℃の蒸留水中に懸濁し、超音波洗浄器を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次に、ノニデット（Noni d e t）P40の0.5容量%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄して胚乳分を除去した小麦胚芽を得た。

- 次いで、以下の操作を4℃で行い、胚芽抽出液（小麦胚芽抽出物含有液）を得た。まず、洗浄した小麦胚芽を抽出溶媒（HEPES-KOH（pH7.6）80mM、酢酸カリウム200mM、酢酸マグネシウム10mM、塩化カルシウム254mM、L型アミノ酸20種類各0.6mM及びジチオスレイトール8mM）100mlとともにワーリングブレンダーに入れ、回転数5000乃至20000rpmで30秒粉碎した。ブレンダー内壁に付着した胚芽等をかき落とした後再び

5000乃至20000 rpmで30秒粉碎する作業を2回行った。得られた胚芽粉碎物の粒径分布をレーザー散乱方式粒度分布装置（堀場製作所製LA-920）を用いて測定した。その結果を図1に示す。

得られた抽出液と粉碎胚芽の混合物を遠心管に移し30000 g、30分間の遠心をかけ上清を採取した。これをさらに30000 g、30分間の遠心をかけ上清を採取する操作を5回繰り返し濁りのない上清を得た。これをあらかじめ溶液（HEPES-KOH（pH 7.6）40 mM、酢酸カリウム100 mM、酢酸マグネシウム5 mM、L型アミノ酸20種類各0.3 mM及びジチオスレートル4 mM）で平衡化しておいたセファデックスG-25カラムでゲルろ過を行った。得られた液を30000 g、12分間の遠心をかけ上清を採取し、これを小麦胚芽抽出物含有液とした。試料の濃度は、260 nmにおける光学密度（O. D.） (A_{260}) が80～150 ($A_{260}/A_{280} = 1.5$) になるように抽出溶媒で調整した。

実施例2 透析法による小麦胚芽無細胞タンパク質合成系の調製

15 実施例1で得られた小麦胚芽抽出物含有液を260 nmにおける光学密度（O. D.） (A_{260}) が90になるよう抽出溶媒で濃度調整し、Green fluorescent Protein (GFP) の合成を “Endo, Y. et al., PNAS, January 18, 2000/vol. 97/no. 2/559-564” に記載の方法に準じて行った。GFP活性は、Turner Designs社製のTD-360 Mini-Fluorometerを用いて、490 nmの励起波長で510 nmの蛍光強度から定量した。図3に示すように（図3中、ブレンダー法と表示）蛍光強度が24時間後に約350000、48時間後に480000と観察され、GFPが合成されていることが確認できた。

実施例3 小麦胚芽抽出物含有液の分析（1）

北海道産のチホク小麦（未消毒）を用いて、実施例1と同様の方法で小麦胚芽抽出物含有液を調製した。試料を260 nmにおける光学密度（O. D.） (A_{260}) が90になるよう抽出溶媒で濃度調整し、各試料のDNA及びRNAの含有量を測定した。その結果を以下に示す。

	RNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
試料 a 1	1 4 1 1	1 4 1
試料 a 2	1 5 5 4	1 4 2

なお、DNA及びRNAの含有量の測定方法は以下の通りである。

5 DNA含有量の測定方法

PicoGreen dsDNA quantitation reagent (モレキュラープローブ社製) を用い、Calf Thymus DNA Standard (ファルマシアバイオテク社製) を標準試料として、マイクロプレート蛍光光度計 (SPECTRAmax GEMINI XS, モレキュラーデバイス社製) を用いて測定した。

- 10 まず、試料 $200\ \mu\text{l}$ に proteinase K ($10\ \text{mg}/\text{ml}$) を $10\ \mu\text{l}$ 加え、 55°C で一晩反応した。反応液を等量のフェノールで抽出後、さらに等量のフェノール・クロロフォルム (1 : 1) で抽出して除蛋白し、 $1/10$ 量の 3M 酢酸ナトリウムおよび 2 倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。 70% エタノールで洗浄後、 1mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含む 10mM Tris-HCl 缓衝液 ($\text{pH}\ 8.0$) (TE) に溶解した。この溶液に RNase A ($10\ \text{mg}/\text{ml}$) を $5\ \mu\text{l}$ 加えて 37°C で一晩反応させ、上記と同様にフェノールおよびフェノール・クロロフォルムで抽出して RNA を除去した。試料はエタノール沈殿・洗浄し、TE $200\ \mu\text{l}$ に溶解した。TE で 200 倍に薄めた PicoGreen dsDNA quantitation reagent と TE で 100 倍に薄めた試料を $1 : 1$ の比率で混ぜ、励起／蛍光波長 $485/530\text{ nm}$ で蛍光度測定して、標準曲線から DNA 含有量を算出した。

RNA含有量の測定方法

蛍光試薬として BioGreen RNA Quantitation reagent (モレキュラープローブ社製) を用い、Ribosomal RNA standard (16S and 23S rRNA from E. coli)

- 25 (モレキュラープローブ社製) を標準 RNA として、マイクロプレート蛍光光度計 (SPECTRAmax GEMINI XS, モレキュラーデバイス社製) を用いて測定した。

まず、抽出液 $100\ \mu\text{l}$ に DNase I (RNase free, $1\text{U}/\mu\text{l}$) を $3\ \mu\text{l}$ 加

え、37°Cで30分反応させた。反応液に300μlの精製水を加え、400μlの水飽和フェノールで2回抽出後、さらに400μlのクロロフォルムで抽出してDNAを除去した。そこに、1/10量の3M酢酸ナトリウムおよび2倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行い、100μlのTEに溶解した。さ
5 らにTEで1500倍に薄めた試料100μlにBioGreen RNA Quantitation reagentの200倍稀釀液100μlを加え、励起／蛍光波長480/520nmで蛍光度測定して、標準曲線からRNA含有量を算出した。

実施例4 小麦胚芽抽出物含有液の分析（2）

北海道産のチホク小麦（未消毒）を用いて、実施例1と同様の方法で小麦胚芽
10 抽出物含有液を調製した。試料を260nmにおける光学密度（O. D.）（A₂₆₀）が9.0になるように抽出溶媒で濃度調整して、各試料の脂質（酸分解法）及び総脂肪酸（ガスクロマトグラフ法）の含有量を測定した。その結果を以下に示す。

	<u>脂質(g/100g)</u>	<u>総脂肪酸(g/100g)</u>
15 試料a 3	検出限界以下	0.03
試料a 4	検出限界以下	0.03

なお、脂質及び脂肪酸の含有量の測定方法は以下の通りである。

脂質含有量の測定法（酸分解法）

容器中に試料(S) 5.0g及び濃塩酸10ミリリットルを入れ、80°Cの湯
20 浴で40分間加熱して酸分解を行った。得られた分解物をエチルエーテルでマジオニア管に移し、ジエチルエーテル-石油エーテル混液（容量比1:1）で振とう抽出を行った。エーテル層が酸性を示さなくなるまでイオン交換水で洗浄した。エーテル層を回収して秤量容器(W₁g)に移し、エーテルを留去した後、さらに105°Cで1時間乾燥処理して、秤量した(W₂g)。下記式により脂質
25 含有量(g/100g)を算出した。

$$\text{脂質含有量(g/100g)} = (W_2 - W_1) \div S \times 100$$

総脂肪酸含有量の測定法（ガスクロマトグラフ法）

試料 5. 0 g に、ヘプタデカン酸 2 mg (内標準) 、エタノール 4 ミリリットル、イオン交換水 6. 7 ml 及び 1.2 モル／リットルの塩酸 8. 3 ミリリットルを添加し、酸分解を行った。次いで、エタノール 1.6 ミリリットルを添加し、ジエチルエーテル－石油エーテル混液 (容量比 1 : 1) 100 ミリリットルを添加して抽出処理し、該混液 60 ミリリットルによる抽出処理を 2 回行った。水洗、抽出溶媒留去の後、ACOS Official Method Ce 1b-89 (1997) に準じて、けん化及びメチルエステル化を行った後、下記の操作条件でガスクロマトグラフによる測定を行った。

<ガスクロマトグラフ操作条件>

10 測定機種：島津製作所製 GC-17A

検出器：FID

カラム：J & W 製 DB-23, $\phi 0.25\text{mm} \times 30\text{mm}$, df. $0.25\mu\text{m}$

カラム温度：70°C (1 分間保持) → 170°C (10°C/分昇温) → 210°C
(1. 2°C/分昇温)

15 注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

ガス流量：ヘリウム 1. 5 ミリリットル／分

ガス圧力：水素 60 kPa、空気 50 kPa

導入系：スプリットレス

20 得られた測定値から下記式により、各脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸及びリノール酸) の含有量を計算し、これらから総脂肪酸含有量を算出した。

$$\text{各脂肪酸含有量 (g/100g)} = (\text{E} \times \text{F} \times \text{H} / \text{D} \times \text{G}) \times 0.1$$

(上記式中、D はヘプタデカン酸のピーク面積、E は各脂肪酸のピーク面積、F はヘプタデカン酸添加量 (mg) 、G は試料採取量、H は感度補正係数 (予め測

25 定したヘプタデカン酸に対する各脂肪酸の感度) を表す。)

実施例 5 小麦胚芽抽出物含有液の分析 (3)

岡山県産のシラサギ小麦 (未消毒) を用いて、実施例 1 と同様の方法で小麦胚

芽抽出物含有液を調製し、試料を 260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A₂₆₀) が 90 になるように抽出用緩衝液で調整し、DNA 及び RNA の含有量を実施例 3 と同様の方法で測定した。その結果を以下に示す。

	<u>RNA (μg/ml)</u>	<u>DNA (μg/ml)</u>
5 試料 a 5	1401	123

比較例 1 乳鉢による凍結微粉碎抽出 (1)

北海道産のチホク小麦（未消毒）を実施例 1 と同様の方法で、粉碎、選別して、粗胚芽画分を得、色彩選別機で胚芽の純度が 98 %以上になるまで胚芽を選別した。更に、実施例 1 と同様の方法で胚芽を洗浄し、胚乳分を除去した小麦胚芽を得た。

次いで、以下の操作を 4°C で行い、小麦胚芽抽出物含有液を得た。まず洗浄した小麦胚芽を液体窒素で凍結し乳鉢中で微粉碎した。得られた胚芽粉碎物の粒径分布を図 2 に示す。

抽出溶媒 (HEPES-KOH (pH 7.6) 80 mM、酢酸カリウム 200 mM、酢酸マグネシウム 10 mM、塩化カルシウム 4 mM、L 型アミノ酸 20 種類各 0.6 mM 及びジチオスレイトール 8 mM) 10 ml を乳鉢に加え混合した。得られた抽出液と粉碎胚芽の混合物を遠心管に移し 30000 g、30 分間の遠心をかけ上清を採取した。これをさらに実施例 1 と同様の条件で、遠心分離して濁りのない上清を得、ゲルろ過後、遠心分離を行い、得られた上清を小麦胚芽抽出物含有液とした。試料の濃度は、260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A₂₆₀) が 170 ~ 250 (A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.5) になるように抽出溶媒で濃度調整した。

比較例 2 透析法による小麦胚芽無細胞タンパク質合成系の調製

比較例 1 で得られた小麦胚芽抽出物含有液を 260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A₂₆₀) が 90 になるように抽出溶媒で濃度調整し、Green fluorescent protein (GFP) の合成を “Endo, Y. et al., PNAS, January 18, 2000/vol. 97/no. 2/559-564” に記載の方法に準じて行った。GFP 活性は、

Turner Designs 社製の TD-360 Mini-Fluorometer を用いて、490 nm の励起波長で 510 nm の蛍光強度から定量した。図 3 に示すように（図 3 中、乳鉢法と表示）蛍光強度が 24 時間後に約 200000、48 時間後に 260000 と観察され、GFP が合成されていることが確認できたが、実施例 2 に比べて低い

5 値であった。

比較例 3 小麦胚芽抽出物含有液の分析（1'）

北海道産のチホク小麦（未消毒）を用いて、比較例 1 と同様の方法で小麦胚芽抽出物含有液を調製した。試料を 260 nm における光学密度（O. D.）（A₂₆₀）が 90 になるように抽出溶媒で濃度調整して、各試料の DNA 及び RNA 10 の含有量を実施例 3 と同様の方法で測定した。その結果を以下に示す。

	<u>RNA (μg/ml)</u>	<u>DNA (μg/ml)</u>
試料 b 1	1567	283
試料 b 2	1574	283
試料 b 3	1578	232

15 上記結果から明らかな通り、RNA 含有量は実施例 3 で得られた胚芽抽出物含有液の値とほぼ同様（試料 a 1 と試料 b 1 との比較では約 1.1 倍）であり、DNA 含有量は約 2 倍であった。

比較例 4 小麦胚芽抽出物含有液の分析（2'）

北海道産のチホク小麦（未消毒）を用いて、比較例 1 と同様の方法で小麦胚芽 20 抽出物含有液を調製した。試料を 260 nm における光学密度（O. D.）（A₂₆₀）が 90 になるように抽出溶媒で濃度調整し、実施例 4 と同様に各試料の脂質（酸分解法）及び総脂肪酸（ガスクロマトグラフ法）含有量を測定した。その結果を以下に示す。

	<u>脂質 (g/100g)</u>	<u>総脂肪酸 (g/100g)</u>
25 試料 b 4	0.1	0.06
試料 b 5	0.05	0.05

上記結果から明らかな通り、脂質および総脂肪酸の含有量とともに、実施例 4 で

得られた胚芽抽出物含有液の含有量の値よりも高く、総脂肪酸含有量については、試料 a 3 と試料 b 4 との比較において 2 倍であった。

実施例 6 ワーリングブレンダーによる微粉碎抽出（2）

北海道産のチホク小麦（未消毒）を用い、胚芽の抽出溶媒として塩化カルシウムを含有しない抽出溶媒（HEPES-KOH（pH 7.8）80 mM、酢酸カリウム 200 mM、酢酸マグネシウム 10 mM、L型アミノ酸 20 種類各 0.6 mM 及びジチオスレイトール 8 mM）を用いた以外は実施例 1 と同様の方法で、小麦胚芽抽出物含有液を得た。試料の濃度は、260 nm における光学密度（O.D.） (A_{260}) が 80 ~ 150 ($A_{260}/A_{280} = 1.5$) になるように抽出

10 溶媒で調整した。

実施例 7 バッチ式小麦胚芽無細胞タンパク質合成反応（1）

実施例 6 で得られた小麦胚芽抽出物含有液を 260 nm における光学密度（O.D.） (A_{260}) が 110 になるように抽出溶媒で濃度調整し、反応溶液の調製および反応方法は既報（Madin, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 559-564）に従って、これを一部改変して行った。すなわち、下記（*1）に示した組成の反応溶液の調製を行った。

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系専用発現ベクター（pEU）に組み込んだジヒドロ葉酸脱水素酵素（DHFR）遺伝子から転写して調製した DHFR mRNA (キャップ構造なし) をモデル翻訳錆型（WO01/27260 号公報）
20 として、 $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し、26°Cで合成反応を行った。合成活性は 26°C、2 時間の反応で $5 \mu\text{l}$ 反応溶液中のタンパク質に取り込まれた [^{14}C] - ロイシンから測定した。

ここで、tRNA の添加要否を確認するため、tRNA の添加量を $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1, 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ の 4 ケースで合成を行った結果、tRNA を添加しなくとも十分な合成活性が得られた（図 4 中、ブレンダー法と表示）。また、この結果から、抽出溶媒にカルシウムが存在しなくとも充分なタンパク質合成活性を有する胚芽抽出物含有液が得られることが明らか

かとなった。

(* 1) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成溶液の組成

- 反応溶液は、260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が200の抽出液では反応容量の24%のコムギ胚芽抽出液（従って、260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が110の場合では43.5%）を含み、次の成分組成である。30 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、95 mM 酢酸カリウム、2.65 mM 酢酸マグネシウム、2.85 mM ジチオスレイトール、1.2 mM アデノシン三リン酸 (ATP)、0.25 mM グアノシン三リン酸 (GTP)、1.6 mM クレアチニン酸、0.5 mg/ml クレアチニナーゼ、0.380 mM スペルミジン、20種類のL型アミノ酸（各0.3 mM）、100 units/ml リボヌクレアーゼ阻害剤 (RNase インヒビター)。

比較例5 乳鉢による凍結微粉碎抽出 (2)

- 北海道産のチホク小麦（未消毒）を用い、胚芽の抽出溶媒として塩化カルシウムを含有しない抽出溶媒 (HEPES-KOH (pH 7.8) 80 mM、酢酸カリウム 200 mM、酢酸マグネシウム 10 mM、L型アミノ酸 20種類各 0.6 mM 及びジチオスレイトール 8 mM) を用いた以外は実施例1と同様の方法で、小麦胚芽抽出物含有液を得た。試料の濃度は、260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が 170 ~ 250 ($A_{260}/A_{280} = 1.5$) になるように抽出溶媒で調整した。

比較例6 バッチ式小麦胚芽無細胞タンパク質合成反応

- 比較例5で得られた小麦胚芽抽出物含有液を260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が210になるよう濃度調整し、実施例7と同様に、反応溶液を調製して、タンパク質合成を行い、タンパク質に取り込まれた [¹⁴C] - ロイシンを測定した。なお、反応溶液は、260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が200の抽出液では反応容量の24%のコムギ胚芽抽出液（従って、260 nmにおける光学密度 (O. D.) (A_{260}) が210の場合では22.8%）を含むものを用いた。

図4から明らかな通り、実施例7と同様にtRNAの添加量を0 μg/m1、50 μg/m1、100 μg/m1、150 μg/m1の4ケースで合成を行った結果、tRNAを添加しない場合は十分な合成活性が得られなかった（図4中、乳鉢法と表示）。

5 実施例8 リボヌクレアーゼ活性の測定

（1）胚芽抽出液

リボヌクレアーゼ活性測定用のコムギ胚芽抽出液として、本発明の胚芽抽出液（実施例1）と、従来法により抽出することによって得られる抽出液（比較例1）を用いた。活性測定のため、従来の胚芽抽出液は、30 mM H e p e s -
10 KOH (pH 7.8)、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM
ホスホクレアチニン、2 mM ジチオスレイトール、0.3 mM スペルミジン、0.3 mM 20種アミノ酸、2.5 mM 酢酸マグネシウム、100 mM
酢酸カリウム、0.005% アジ化ナトリウム（以下、D. B. と称す）を含む、MicroSpin G-25 Columnで交換したものを用いた。本
15 発明の抽出液は、D. B. を含んでいる。OD₂₆₀測定値に基づいて、両胚芽抽出液（本発明の胚芽抽出液および従来法で抽出して得られる胚芽抽出液）の濃度
を揃えた。

（2）反応液の調製

リボヌクレアーゼの基質として、pEU-DHFR (WO 01/27260号
20 公報参照) をセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いてPCRを行い、それを鑄型に転写し得られたmRNAを用いた。転写は、80 mM H e p e s -KOH、16 mM 酢酸マグネシウム、2 mM スペルミジン、10 mM DTT、3 mM NTP、1 U/μl SP6 RNAポリメラーゼ、1 U/μl RNaseインヒビター (RNasin)、10% PCR産物となるように反応
25 系400 μlを調製し、37°C、3時間保温した。mRNAをラジオアイソトープ³²Pで標識する場合は、UTPの濃度を1.2 mMにした反応系400 μl
中に [α-³²P] UTP 8 μlを加えた。保温後、10,000 g、2分間

遠心後の、上清に 7. 5 M 酢酸アンモニウム $53 \mu\text{l}$ 、エタノール 1ml を加え、 $20,000\text{g}$ 、15分遠心を行った。沈殿を 1ml の 70% エタノールで洗ったあと、 $80 \mu\text{l}$ の D. B. に溶かした RNA を用いた。以下にそれぞれの組成を示す。

5

ラジオアイソトープ無し mRNA

5 x TB	$80 \mu\text{l}$
25 mM NTP	$48 \mu\text{l}$
S P 6 RNA ポリメラーゼ	$5 \mu\text{l}$
Q RNase インヒビター	$5 \mu\text{l}$
DNA	$40 \mu\text{l}$
M i l l i Q 水	$222 \mu\text{l}$
	<hr/> $400 \mu\text{l}$

10

ラジオアイソトープ有り mRNA

5 x TB	$80 \mu\text{l}$
25 mM ATP CTP GTP	$48 \mu\text{l}$
10 mM UTP	
[$\alpha - ^{32}\text{P}$] UTP	$8 \mu\text{l}$
S P 6 RNA ポリメラーゼ	$5 \mu\text{l}$
Q RNase インヒビター	$5 \mu\text{l}$
DNA	$40 \mu\text{l}$
M i l l i Q 水	$214 \mu\text{l}$
	<hr/> $400 \mu\text{l}$

(3) RNA 分解のコントロール (RNase A の標準品による検定)

RNA 分解のコントロールとして mRNA (ラジオアイソトープ無し) $2 \mu\text{l}$ 、 mRNA (ラジオアイソトープ有り) $1 \mu\text{l}$ に RNase A をそれぞれ 30 pg 、
15 300 pg 、 3 ng 、 30 ng 加えて、 $30 \mu\text{l}$ の反応系になるように D. B. で調製し、 26°C 、30分保温した。以下にそれぞれの組成を示す。

mRNA (ラジオアイソトープ無し)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
mRNA (ラジオアイソトープ有り)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
RNase A	-	30 pg	300 pg	3 ng	30 ng
D. B.					
総計	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl	30 μl

本発明の胚芽抽出液と従来法による胚芽抽出液に含まれるリボヌクレアーゼの活性は、反応系にmRNA (ラジオアイソトープ無し) 2 μl、mRNA (ラジオアイソトープ有り) 1 μlと、終濃度を40 OD₂₆₀/mlとなるようにそれぞれ8 μlあるいは12 μlを加えD. B. で30 μlにする。各4本調製し26°C保温した。

	本発明の 胚芽抽出液	従来の 胚芽抽出液
mRNA (ラジオアイソトープ無し)	2 μl	2 μl
mRNA (ラジオアイソトープ有り)	1 μl	1 μl
胚芽抽出液	8 μl	12 μl
D. B.	19 μl	15 μl
総計	30 μl	30 μl

- 10 保温10分、30分後に、液体窒素で凍らし反応を停止する。Milli Q水 255 μl、10% SDS 15 μl、フェノール/milli Q水 300 μlを加え10分間ボルテックスをかけ、20,000 gで10分間遠心した。水相300 μlを新しいチューブに移し、フェノール/milli Q 300 μlを加え10分間ボルテックスをかけ、20,000 gで10分間遠心した。水相300 μlを新しいチューブに移し、クロロホルム300 μlを加え10分間ボルテックスをかけ、20,000 g、1分間遠心した。水相300 μl
- 15

- を新しいチューブに移し、5M塩化ナトリウム30μl、エタノール750μlを加え、20,000g、15分遠心した。沈殿を1mlの70%エタノールで洗ったあと、54μlのm l l i Q水に溶かし6μlの10×S a m p l e b u f f e r (0.25%プロモフェノールブルー、50mM Tris-5HCl pH 7.6、6%グリセロール)を加え、5μlのサンプルを1.2%アガロースで電気泳動を行った。オートラジオグラム(FUJIFILM:BAS-2500)でRNAの分解の有無を確認した。結果を図5に示す。Mはマークを表す。(A)は、基質であるmRNAを、濃度を4段階に変えて調製したRNase A含有溶液で処理した場合のRNA分解の様子を示した図である。
- 10 (B)は、基質であるmRNAを、本発明の胚芽抽出液あるいは従来法による抽出によって得られる胚芽抽出液で処理した場合のRNAの分解を示す図である。RNase A処理においては、100pg/mlのRNase AでmRNAはほぼ完全に分解された。本発明の胚芽抽出液と従来の胚芽抽出液のそれぞれのバンド強度は、RNase A未処理のものを100%としてImageGauge
- 15 (FUJIFILM:BAS2500)のPLSから算出した。結果を図6に示す。本発明の抽出液あたりのリボヌクレアーゼは、RNase A換算で10pg/μl以下であることが分かる。

- 本発明により、上記した優れた特性を有する胚芽抽出液が得られる理由は必ずしも明確ではないが、次の通りと考えられる。
- 植物胚芽中のタンパク質合成系(リボソーム、tRNA、アミノアシルtRNA酵素、翻訳因子等)は、発芽時の細胞核における転写に続いて細胞質へ移送されるmRNAの供給に呼応して始動する活発なタンパク質合成に備えて準備されているが、そのすべての因子は、翻訳反応の生じる細胞質内にのみ局在している。
- 25 即ち、タンパク質合成に関する因子は、細胞質以外の部分(胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁等)には存在していない。細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁等にはタンパク質合成に関する不要なDNAや脂質が含まれ

ているため、従来のように凍結した胚芽を、乳鉢、スタンプミル、ボールミル等によって摩碎又は圧碎することにより微粉碎し、その後で抽出溶媒で抽出するという方法によって得られた胚芽抽出物含有液にはこれらのタンパク質合成反応に関与しない不要な成分が多く含まれている。

- 5 タンパク質合成反応に関与しない成分には、タンパク質合成反応を阻害したり、合成産物の高次構造形成や、機能解析において妨害作用を示したりするものがある。例えば、DNAは酸性のポリマーであり、リボソームタンパク質等の塩基性タンパク質に結合して翻訳反応を阻害し得るし、さらにDNA結合タンパク質合成時においては、胚芽由来のDNA断片の中にこれに強く結合する塩基配列を有するものがあり得る。また、脂肪成分は一般的にタンパク質の精製過程の妨害物質であることが多く、通常、前処理操作で除去することが必要となっている。その他、低分子量物質の中にはタンパク質合成阻害作用を有するものも存在している可能性がある。

又、リボヌクレアーゼの混入は、鑄型mRNAの分解を招き、ホスファターゼの混入はATP等のエネルギー源の分解を招く。

- 本発明では細分化を抽出溶媒存在下に行うか、あるいは衝撃または切断により胚芽を細分化した後抽出溶媒を添加し抽出する、胚芽抽出液（無細胞タンパク質合成系に有用である）を提供する。細分化にあたり衝撃または切断という従来用いられてこなかった新しい手法を利用することにより、細胞核等の細胞小器官、
20 細胞膜や細胞壁等が必要以上に破壊されることなく、従って、従来法で問題となっていたタンパク質合成反応に関与しない不要な成分あるいは悪影響を及ぼす成分が抽出されるのを防ぐことができる。また、細分化を摩碎や圧碎といった従来法を利用して胚芽抽出液を調製する場合でも、当該細分化を抽出溶媒存在下で行うことにより、より迅速な抽出が可能となり、それに伴って細胞核等の細胞小器官、
25 細胞膜や細胞壁等が必要以上に破壊されることなく、従って、やはりタンパク質合成反応に関与しない不要な成分あるいは悪影響を及ぼす成分が抽出されるのを防ぐことができる。

産業上の利用可能性

本発明によれば、タンパク質合成に必要な因子を効率的に細胞質から抽出し、細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁等に含まれるDNAや脂質等の不純物の5 少ない胚芽抽出液を得ることができるために、安定で高い効率の無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液および無細胞タンパク質合成用溶液を提供することができる。本発明のタンパク質合成用胚芽抽出液またはタンパク質合成用溶液を用いることにより、安定で高い効率の無細胞タンパク質合成が達成できる。また、短時間に高純度の胚芽抽出液を大量に製造することができるため、タンパク質の無細胞系10 での大量調製、たとえば、進化分子工学の分野での新しい酵素や抗体の大量調製に極めて有用である。

本出願は、日本で出願された特願2002-23138、特願2002-23139及び特願2002-23140を基礎としておりそれらの内容は本明細書15 に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. リボヌクレアーゼ活性が低減された、植物胚芽抽出液。
 - 5 2. リボヌクレアーゼ活性がRNAse A換算で $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以下である、請求の範囲1記載の胚芽抽出液。
 3. 抽出溶媒非存在下に植物胚芽を摩碎または圧碎して細分化する工程を含む方法により得られる胚芽抽出液と比較してリボヌクレアーゼ活性が80%以下に低減された請求の範囲1または2記載の胚芽抽出液。
 - 10 4. 260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が90の時のDNA含有量が $230\text{ }\mu\text{g}/\text{ミリリットル}$ 以下であることを特徴とする植物胚芽抽出液。
 - 15 5. 260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が90の時の総脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸及びリノール酸)含有量の合計量が $0.03\text{ g}/100\text{ g}$ 以下である植物胚芽抽出液。
 - 20 6. 260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が90の時のDNA含有量が $230\text{ }\mu\text{g}/\text{ミリリットル}$ 以下であり、かつ総脂肪酸含有量が $0.03\text{ g}/100\text{ g}$ 以下である植物胚芽抽出液。
 7. 植物胚芽が、コムギ、オオムギ、イネ又はコーンの胚芽である請求の範囲1～6のいずれか1項に記載の胚芽抽出液。
- 25
8. 植物胚芽を衝撃又は切断により細分化する工程を含む、植物胚芽抽出液の製造方法。

9. 抽出溶媒の存在下に植物胚芽を細分化する工程を含む、植物胚芽抽出液の製造方法。

5 10. 抽出溶媒が、緩衝液、カリウムイオン、マグネシウムイオン及びチオール基の酸化防止剤からなる群より選択される 1 以上を含むものである請求の範囲 9 記載の製造方法。

11. 細分化が衝撃又は切断により行われるものである、請求の範囲 9 記載の製造方法。

12. 植物胚芽が、胚乳成分が実質的に夾雜しないものである請求の範囲 8 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

15 13. 植物胚芽が、コムギ、オオムギ、イネ又はコーンの胚芽である請求の範囲 8 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

14. 請求の範囲 8 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の製造方法により得られる植物胚芽抽出液。

20

15. 請求の範囲 1 ~ 7 および 1 4 のいずれか 1 項に記載の胚芽抽出液を使用することを特徴とする無細胞タンパク質合成方法。

16. 請求の範囲 1 ~ 7 および 1 4 のいずれか 1 項に記載の胚芽抽出液、ATP、
25 GTP、クレアチニン酸、クレアチンキナーゼ、L型アミノ酸、カリウムイオン及びマグネシウムイオンを含有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用溶液。

17. 請求の範囲1～7および14のいずれか1項に記載の胚芽抽出液を含有する無細胞タンパク質合成用溶液であって、tRNAを添加しなくとも十分なタンパク質合成活性を有することを特徴とする無細胞タンパク質合成用溶液。

5

18. 請求の範囲1～7および14のいずれか1項に記載の胚芽抽出液を含むこととを特徴とする無細胞タンパク質合成を行うためのキット。

19. 請求の範囲16または17記載の無細胞タンパク質合成用溶液を含むこと10を特徴とする無細胞タンパク質合成を行うためのキット。

图 1

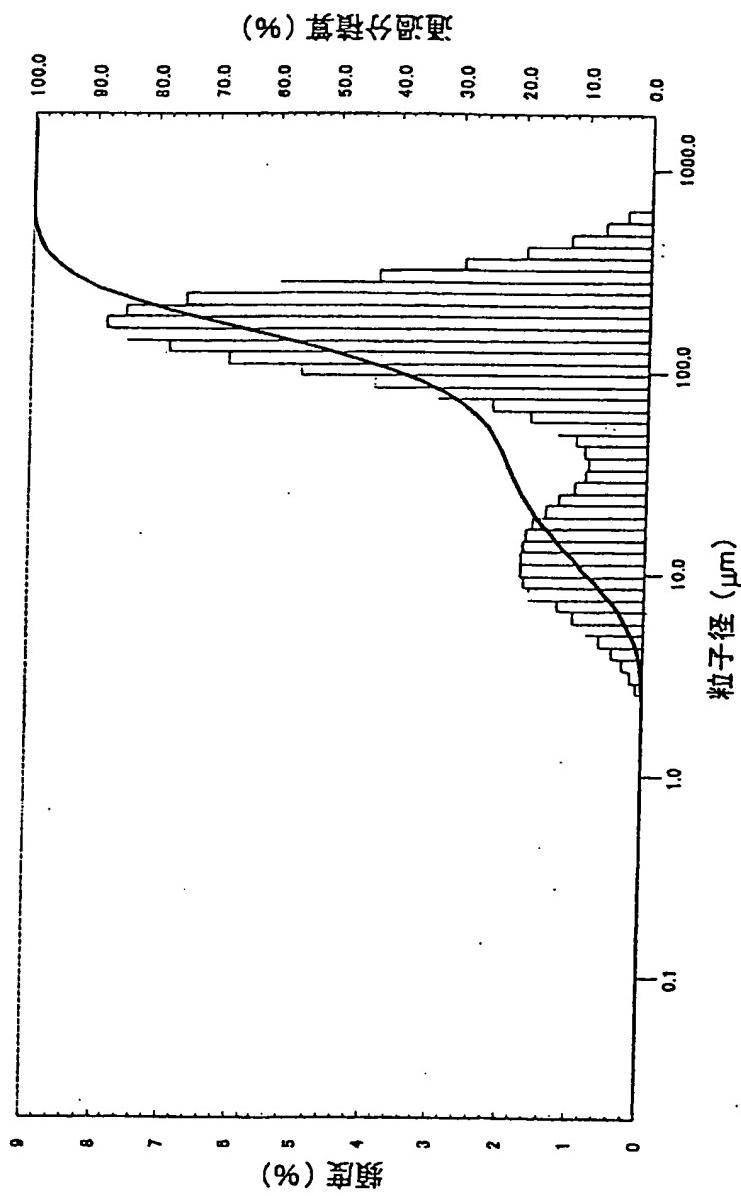


図2

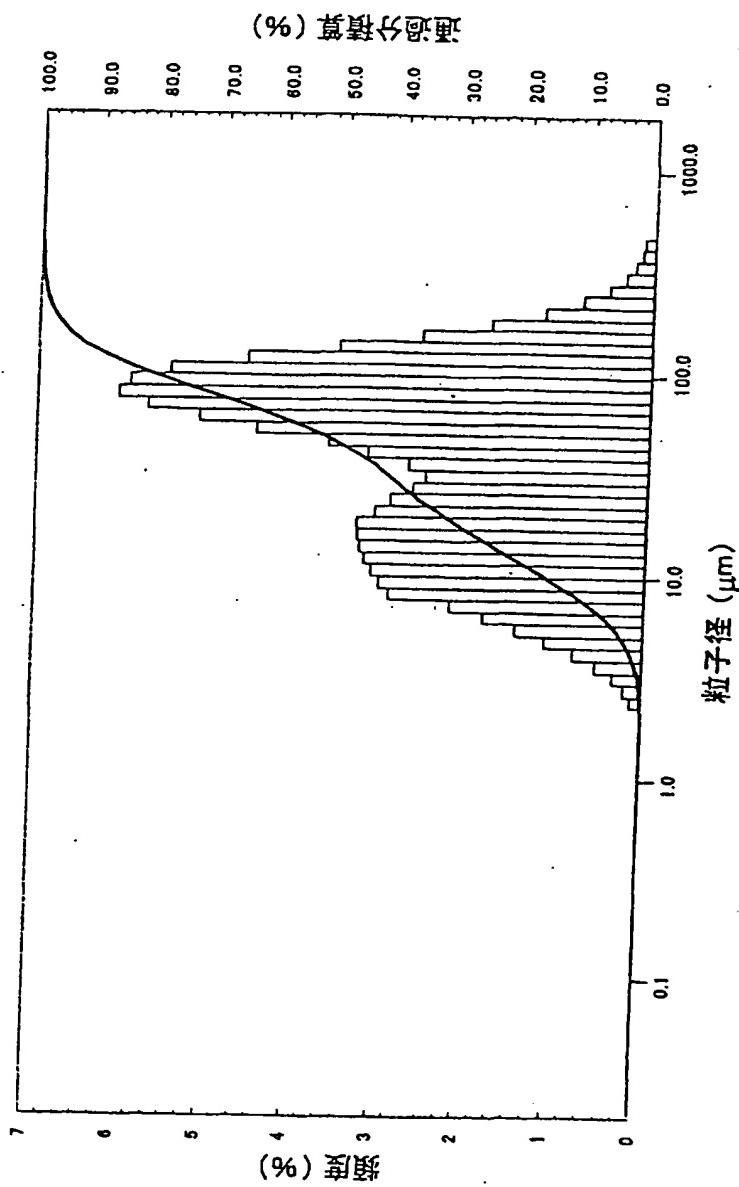


図 3

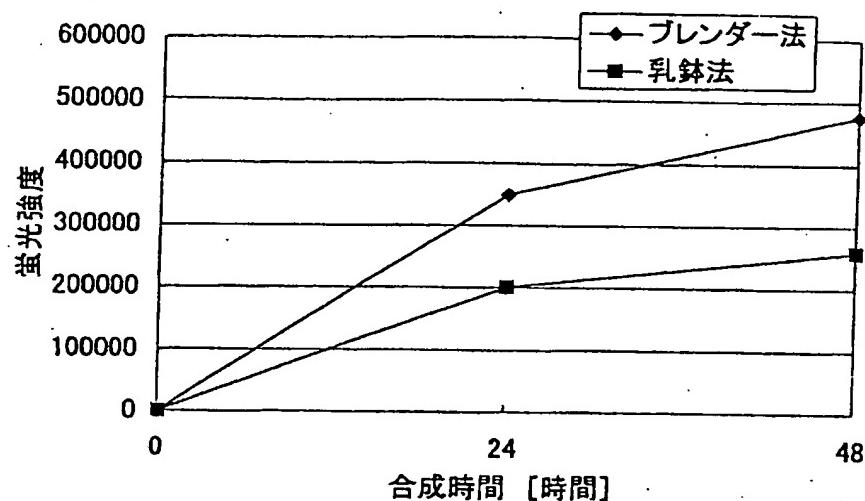
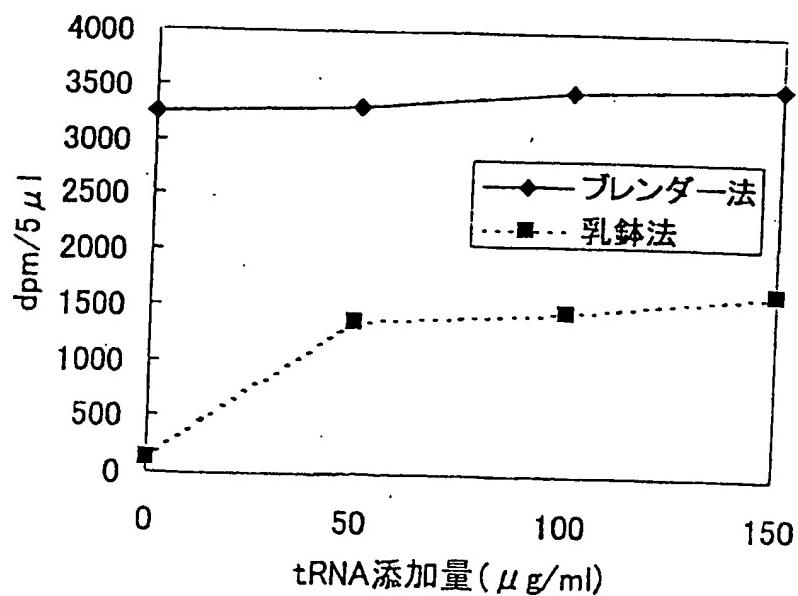


図 4



3/4

図 5

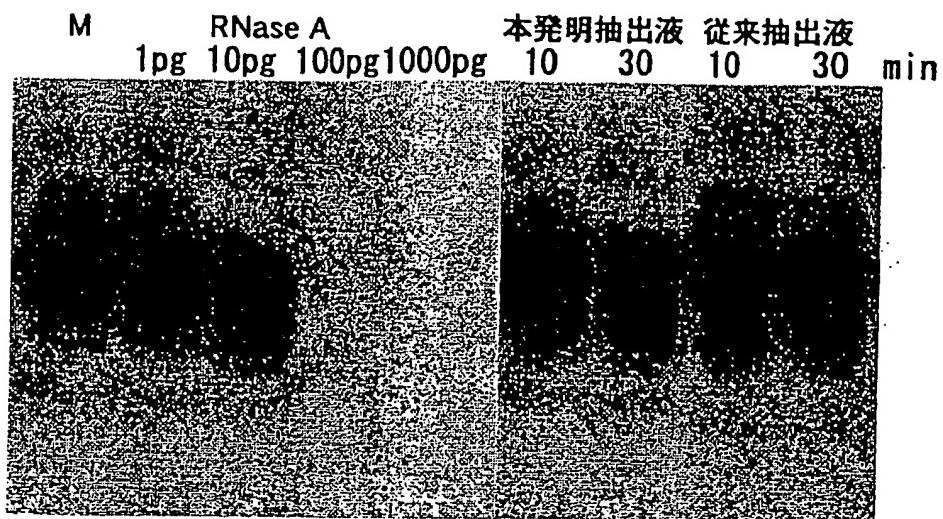
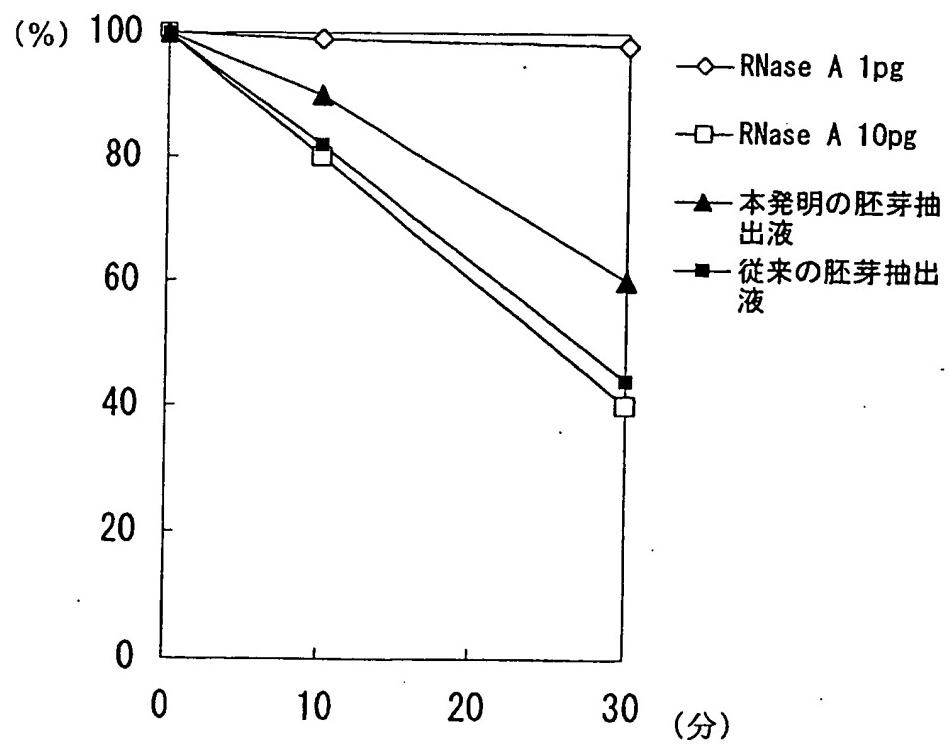


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00995

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 00/68412 A1 (WAKENYAKU KABUSHIKI KAISHA), 16 November, 2000 (16.11.00), Especially, page 6, line 8 to page 7, line 18; page 19, line 20 to page 21, line 9 & AU 9949301 A & EP 1176210 A1 & KR 2001-112953 A & JP 2000-333673 A & JP 2000-316594 A & JP 2000-316595 A	<u>1-3, 7, 15-19</u> 4-6, 8-14
X Y	JP 2000-236896 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.), 05 September, 2000 (05.09.00), (Family: none)	<u>1-3, 7, 15-19</u> 4-6, 8-14
Y	US 5593856 A (CHOI C.), 14 January, 1997 (14.01.97), & KR 131166 B1 & JP 7-298893 A	4-6

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 22 May, 2003 (22.05.03)	Date of mailing of the international search report 27 May, 2003 (27.05.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-225783 A (NIPPON SEIFUN KABUSHIKI KAISHA), 16 August, 1994 (16.08.94), (Family: none)	4-6
Y	WO 93/7287 A1 (PROMEGA CORP.), 15 April, 1993 (15.04.93), Especially, page 15, lines 4 to 6 & AU 9227921 A & EP 566714 A1 & JP 6-503477 A & US 5324637 A & AU 660329 B & US 5492817 A & EP 566714 B1 & DE 69216385 E & ES 2097363 T3 & JP 2904583 B2	8-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00995

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 3, 7 and 15 to 19 relate to a plant germ extract having reduced ribonuclease activity and a cell-free protein synthesis method using the same. The inventions as set forth in claims 4 to 6, 7 and 15 to 19 relate to a plant germ extract having lowered DNA content and a lowered total fatty acid content and a cell-free protein synthesis method using the same. The inventions as set forth in claims 8 to 19 relate to a process for producing a plant germ extract, a plant germ extract obtained by the production process and a cell-free protein synthesis method using the same.

(continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00995

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but regarded as three groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int C1' C12P21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int C1' C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JST Plus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 00/68412 A1 (WAKENYAKU KK) 2000.11.16 especially page 6, line 8～page 7, line 18, page 19, line 20～ page 21, line 9 &AU 9949301 A &EP 1176210 A1 &KR 2001-112953 A &JP 2000-333673 A &JP 2000-316594 A &JP 2000-316595 A	1～3, 7, <u>15～19</u> 4～6, 8～ 14
X Y	JP 2000-236896 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 2000.09.05 ファミリー無し	1～3, 7, <u>15～19</u> 4～6, 8～ 14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.05.03

国際調査報告の発送日

27.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 5593856 A (CHOI C) 1997.01.14 &KR 131166 B1 &JP 7-298893 A	4~6
Y	JP 6-225783 A (NIPPON SEIFUN KK) 1994.08.16 ファミリー無し	4~6
Y	WO 93/7287 A1 (PROMEGA CORP) 1993.04.15 especially page 15, line 4~6 &AU 9227921 A &EP 566714 A1 &JP 6-503477 A &US 5324637 A &AU 660329 B &US 5492817 A &EP 566714 B1 &DE 69216385 E &ES 2097363 T3 &JP 2904583 B2	8~14

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1乃至3、7、15乃至19はリボヌクレアーゼ活性が低減された植物胚芽抽出液及びそれを用いた無細胞タンパク質合成方法に係る発明であり、請求の範囲4乃至6、7、15乃至19はDNA含有量及び総脂肪酸含有量が低減した植物胚芽抽出液及びそれを用いた無細胞タンパク質合成方法に係る発明であり、請求の範囲8乃至19は植物胚芽抽出液の製造方法、該製造方法により得られた植物胚芽抽出液及びそれを用いた無細胞タンパク質合成方法に係る発明である。

ここで、これらの発明は单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められず、3個の発明からなる発明群であると認める。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.